

Steroidsulfatierung – von Sexual hormonen und neuen Krebsmedikamenten

Reuper, Hendrik; Mueller, Jonathan Wolf

DOI:

[10.1007/s12268-016-0750-8](https://doi.org/10.1007/s12268-016-0750-8)

License:

None: All rights reserved

Document Version

Peer reviewed version

Citation for published version (Harvard):

Reuper, H & Mueller, JW 2016, 'Steroidsulfatierung – von Sexual hormonen und neuen Krebsmedikamenten', *BioSpektrum*, vol. 22, no. 7, pp. 717-719. <https://doi.org/10.1007/s12268-016-0750-8>

[Link to publication on Research at Birmingham portal](#)

Publisher Rights Statement:

Eligibility for repository: Checked on 30/11/2016

General rights

Unless a licence is specified above, all rights (including copyright and moral rights) in this document are retained by the authors and/or the copyright holders. The express permission of the copyright holder must be obtained for any use of this material other than for purposes permitted by law.

- Users may freely distribute the URL that is used to identify this publication.
- Users may download and/or print one copy of the publication from the University of Birmingham research portal for the purpose of private study or non-commercial research.
- User may use extracts from the document in line with the concept of 'fair dealing' under the Copyright, Designs and Patents Act 1988 (?)
- Users may not further distribute the material nor use it for the purposes of commercial gain.

Where a licence is displayed above, please note the terms and conditions of the licence govern your use of this document.

When citing, please reference the published version.

Take down policy

While the University of Birmingham exercises care and attention in making items available there are rare occasions when an item has been uploaded in error or has been deemed to be commercially or otherwise sensitive.

If you believe that this is the case for this document, please contact UBIRA@lists.bham.ac.uk providing details and we will remove access to the work immediately and investigate.

Sulfat-Stoffwechsel des Menschen

Steroid-Sulfatierung - von Sex-Hormonen und neuen Krebs-Medikamenten

Hendrik Reuper, Jonathan Wolf Mueller

Institute of Metabolism and Systems Research (IMSR), University of Birmingham

In healthy human physiology, several steroid hormones are regulated in a dynamic equilibrium between sulfation and de-sulfation reactions. Inhibitors of steroid de-sulfation may soon enter clinical practice in cancer treatment. Sulfation pathways also include sulfate activation and transfer and targeting the enzymes involved here may be another pharmacological strategy to boost sulfation pathways.

Die Steroid-Sulfatase (STS) ist ein faszinierendes Enzym, das verschiedene Steroid-Sulfat-Ester als Substrate akzeptiert und diese durch Sulfat-Abspaltung re-aktiviert. In der menschlichen Blutbahn zirkuliert eine erstaunliche Menge an Sulfo-Steroiden (**Abb. 1**); zum Beispiel ist der Androgen-Vorläufer Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS) bei den meisten Menschen in zweistelliger mikromolarer Konzentration messbar **[1]**. Genetische Defekte, die zur Inaktivierung des X-chromosomalen STS-Genes führen, betreffen etwa 1:4000 Männer. Neben einer schuppigen Haut (Ichthyose) wegen der Anhäufung von Cholesterin-Sulfat zeigen Merkmalsträger nur eine geringfügige Beeinträchtigung in ihrer Androgen-Produktion **[2]**.

Da Steroid-Sulfatase-Aktivität vermehrt bei Entzündungsprozessen und in verschiedenen Krebsarten nachweisbar ist, ist die Entwicklung von STS-Inhibitoren für verschiedene Indikationen von Interesse. Irosustat (auch STX64 oder 667Coumate genannt) ist ein irreversibler STS-Inhibitor der ersten Generation **[1]**. In einer klinischen Studie (Phase II) zeigte dieser eine gute Verträglichkeit und senkte bei Östrogen-Rezeptor-positivem Brustkrebs sowohl die Aufnahme eines Nukleosid-Analogons (3'-Deoxy-3'-[18F]-Fluorothymidine) als auch die Menge des Proliferationsmarkers Ki67; beides deutet auf eine effektive Inhibierung des Tumor-Wachstums hin **[3]**. Obwohl die Entwicklung von STS-Inhibitoren vielversprechend ist, lohnt sich ein Blick auf die andere Seite der Sulfatierungswege, auf Sulfat-Aktivierung und Sulfat-Übertragung.

Sulfatierung reguliert die Wirkung von Steroidhormonen

Die meisten Steroidhormone sind steter Sulfatierung und Desulfatierung unterworfen **[4]**. Dieses dynamische Gleichgewicht regelt die biologische Aktivität dieser potenten und weit verbreiteten Hormon-Klasse (**Abb. 2**). Durch Hemmung der Steroid-Sulfatase, sei es durch oben beschriebene genetische Defekte oder durch pharmakologische Intervention, wird das Gleichgewicht in Richtung der sulfatierten Hormone verschoben. Wie aber werden diese erzeugt? DHEAS ist das in der Blutbahn zirkulierende Steroid mit der höchsten Konzentration und Hauptprodukt der *Zona reticularis* des Nebennieren-Cortex **[1]**. Dort ist auch die Expression einer Sulfotransferase, der SULT2A1, stark erhöht. Diese sulfatiert bevorzugt Androgene – wie eben jenes DHEA – sowie eine Vielzahl von Xenobiotica **[1]**.

Genau diese Promiskuität bei der Substratbindung macht jedoch ein pharmakologisches Ansetzen an Sulfotransferasen äußerst schwierig. Wie sieht es aber mit klinisch beobachteten Gendefekten im *SULT2A1*-Gen aus? Eigentlich sollten diese leicht aufzuspüren sein, da die Messung der DHEAS-Konzentration im Serum zum klinischen Alltag gehört. Defekte in der Steroid-Sulfatierung sollten durch einen sehr niedrigen DHEAS-Spiegel gekennzeichnet sein. Solche Patienten sind auch aufgespürt worden, jedoch war deren *SULT2A1*-Gen intakt [5,6]. Der klinisch festgestellte Sulfatierungsdefekt wurde überraschenderweise von Mutationen im Gen für die PAPS-Synthase 2 ausgelöst. Dieses Enzym ist für die Produktion von „aktivem Sulfat“ in der Form von PAPS verantwortlich (3'-Phospho-Adenosin-5'-Phosphosulfat). Jene Bezeichnung „aktives Sulfat“ stammt vom Entdecker des PAPS, Fritz Lipman [7], der an anderer Stelle auch von „aktiver Essigsäure“ redete. Die Synthese von PAPS ist sowohl äußerst energieintensiv als auch mechanistisch von einigem Interesse.

Sulfat-Aktivierung als zentrales Element von Sulfatierungswegen

Sulfat kann als „faules“ Oxy-Anion angesehen werden oder – mit einer Standard-Bildungsenthalpie von -814 kcal/mol (ΔH_f° für H_2SO_4) – als ein sehr stabiles. Somit bedarf es in der Zelle einiger biochemischer Tricks, um Sulfat in das Hoch-Energie-Molekül **PAPS** umzuwandeln, den ubiquitären Sulfat-Donor, in dessen Verwendung Bakterien, Archae-Bakterien und Eukaryoten einander gleichen. Der enzymatische Apparat, der dennoch PAPS in ausreichenden Mengen erzeugt, besteht in allen Tieren aus einer Genfusion aus ATP-Sulfurylase und APS-Kinase – der sogenannten PAPS-Synthase. Was ist zu tun: Zunächst katalysiert ATP-Sulfurylase die extrem unwahrscheinliche Reaktion eines Sulfats, das nucleophil den α -Phosphor eines ATP-Moleküls angreift. Dabei wird Pyrophosphat freigesetzt, gleichzeitig entsteht APS, Adenosin-5'-Phosphosulfat. Bereits jetzt befindet sich oben erwähntes Sulfat in einer Hoch-Energie-Bindung. Das Gleichgewicht ist mit 10^{-8} denkbar ungünstig für diese Reaktion [7]. Die Rück-Reaktion eben dieser Reaktion von Pyrophosphat zu ATP wird dieser Tage - scheinbar um jene ungünstige Gleichgewichtskonstante im realen Leben zu bestätigen - bei der Pyrophosphat-Sequenzierung eingesetzt [8]. Um diese Reaktion in der Zelle dennoch in Richtung der Produktion von APS zu ziehen, wird das freigesetzte Pyrophosphat zügig gespalten. Außerdem phosphoryliert APS-Kinase das Zwischenprodukt APS an dessen Ribose (3'-OH). Fertig ist PAPS – die nahezu universelle Form aktivierten Sulfats.

Alle Vertebraten verfügen über mindestens zwei PAPS-Synthase-Gene: *PAPSS1* und *PAPSS2* [9]. Was diese beiden PAPS-Synthasen funktionell unterscheidet, ist immer noch nur in Ansätzen verstanden. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen beiden Enzymen im Hinblick auf ihre Protein-Stabilität: Während *PAPSS1* ein „normales“ Protein zu sein scheint, liegt *PAPSS2* bei Körpertemperatur bereits zu einem großen Teil entfaltet vor (Abb. 3). Die Bindung von Nucleotiden stabilisiert *PAPSS2*, dies gilt im besonderen Maße für das Zwischenprodukt APS. Dabei bindet APS zunächst an die APS-Kinase-Domäne; bei höherer Konzentration dann auch an die ATP-Sulfurylase [10]. Durch APS-Bindung wird *PAPSS2* nicht nur im Hinblick auf thermische oder chemische Entfaltung stabilisiert; APS unterbindet darüber hinaus auch effektiv die Aggregation von *PAPSS2* und dies bereits bei äquimolarer Konzentration [9]. Somit kann APS als Vorbild für ein chemisches Chaperon von *PAPSS2* angesehen werden. Da im gesunden Menschen die Verfügbarkeit von PAPS stets der limitierende Schritt der Sulfatierung ist, könnte so ein niedermolekulares chemisches *PAPSS2*-Chaperon Sulfatierungswege positiv beeinflussen.

Sulfatierungswege in einem größeren Kontext

Forschung an Sulfatierungswegen ist nicht auf die endokrine Biochemie beschränkt. Andere Isoformen von PAPS-Synthase, Sulfotransferase und Sulfatase haben auch in anderen Forschungsgebieten wie Knochen- und Knorpelbildung, Biotransformation von Xenobiotica, Krebsforschung sowie Virologie ihre Bedeutung. Für die Aufnahme von Sulfat, den Transport von PAPS in den Golgi-Apparat sowie die Membran-Passage von sulfatierten Steroiden gibt es darüber hinaus eine Vielzahl an Transportern [1,4].

Schließlich kommt den kanonischen Nucleotiden APS, PAPS und PAP (3'-Phospho-Adenosin-5'-Phosphat) in dem einen oder anderen biologischen System eine Zweitfunktion als Signalmolekül zu. Das Nebenprodukt der Sulfatierung mittels PAPS ist PAP. Es wirkt beispielsweise in Pflanzen als Signalmolekül, das bei Dürre und Lichtstress akkumuliert wird. Wie diese Stressoren jedoch wahrgenommen werden, war bisher unklar. Nun konnten wir zeigen, dass die PAP-Phosphatase Sal1 selbst der gesuchte Sensor ist. Sie enthält einen Thiol-Schalter und wird bei erhöhter Konzentration reaktiver Sauerstoff-Spezies selektiv oxidiert und dadurch deutlich in ihrer Aktivität gehemmt [11]. Unklar ist derzeit, in wie weit diese Erkenntnisse auf das menschliche System übertragbar sind. Wohin uns Sulfatierungswege noch führen werden, bleibt also spannend.

Abb. 1: Plasma-Konzentrationen zirkulierender Sulfo-Steroide (orange) wurden jenen der freien Hormone gegenüber gestellt (grau). Bei den absoluten Werten handelt es sich um ungefähre Mittelwerte aus [1]. Diese wurden in Kugelvolumen übertragen. Dargestellt sind z.B. 10 μM für DHEAS und 80 pM für freies Estron.

Abb. 2: Sulfatierung und Desulfatierung beeinflussen die biologische Funktion von Steroidhormonen. Sulfotransferasen (SULT) sind auf den Cofactor PAPS zwingend angewiesen; dabei ist stets PAPS limitierend. Das Sulfatierungsgleichgewicht kann entweder durch angekurbelte Sulfatierung oder durch Hemmung der Desulfatierung in Richtung sulfatierter Steroide verschoben werden.

Abb. 3: PAPSS2 ist ein fragiles Protein, das durch Bindung des Nukleotides APS stabilisiert wird. (A) PAPSS2 (P2) entfaltet bei niedrigeren Konzentrationen von chaotropen Reagenzien. (B) Restaktivitäten von APS-Kinase und ATP-Sulfurylase nach Inkubation bei erhöhter Temperatur. (C) APS unterdrückt die Aggregation von PAPSS2 bereits bei äquimolarer Konzentration. (D) Der stabilisierende Effekt von APS auf PAPSS2 kann anhand der Kristallstruktur 1XNJ von PAPSS1 mit gebundenem ADP (rot) und drei APS-Molekülen (blau) molekular erklärt werden. Abbildungen aus [9,10].

Danksagung

Unsere Arbeiten werden von der Europäischen Union (Erasmus, Marie Curie), dem Wellcome-Trust und der Biochemical Society gefördert. Besonderer Dank gilt der Society for Endocrinology für die großzügige Unterstützung einer Steroid-Sulfatierungstagung, die im April 2017 in Birmingham stattfinden wird.



Literatur

- [1] Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J et al. (2015) The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. *Endocr Rev.* 2015 Oct;36(5):526-63
- [2] Idkowiak J, Taylor AE, Subtil S et al. (2016) Steroid Sulfatase Deficiency and Androgen Activation Before and After Puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 101(6):2545-53
- [3] Palmieri C, Szydlo R, Miller M et al. (2016) The effects of the first in class steroid sulfatase inhibitor Irosustat on FLT uptake and Ki67 in estrogen receptor positive early breast cancer. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr e23140)
- [4] Geyer J, Bakhaus K, Bernhardt R et al. (2016) The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* pii: S0960-0760(16)30201-1
- [5] Noordam C, Dhir V, McNelis JC et al. (2009) Inactivating PAPSS2 mutations in a patient with premature pubarche. *N Engl J Med.* 360(22):2310-8
- [6] Oostdijk W, Idkowiak J, Mueller JW et al. (2015) PAPSS2 deficiency causes androgen excess via impaired DHEA sulfation--in vitro and in vivo studies in a family harboring two novel PAPSS2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(4):E672-80
- [7] Lipmann F (1958) Biological sulfate activation and transfer. *Science.* 128(3324):575-80
- [8] Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* 2006 Jan;363(1-2):83-94. Review. PMID: 16165119.
- [9] van den Boom J, Heider D, Martin SR et al. (2012) PAPS synthases, naturally fragile enzymes specifically stabilized by nucleotide binding. *J Biol Chem.* 18;287(21):17645-55
- [10] Mueller JW, Shafqat N (2013) Adenosine-5'-phosphosulfate - a multifaceted modulator of bifunctional PAPS synthases and related enzymes. *FEBS J.* 2013 Jul;280(13):3050-7
- [11] Chan KX, Mabbitt PD, Phua SY et al. (2016) Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplasts by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(31):E4567-76

Korrespondenzadresse

Dr. habil. Jonathan Wolf Mueller
Lecturer in Endocrine Biochemistry
Institute of Metabolism and Systems Research (IMSR)
University of Birmingham
Birmingham B15 2TT, UK
www.birmingham.ac.uk/IMSR
j.w.mueller@bham.ac.uk

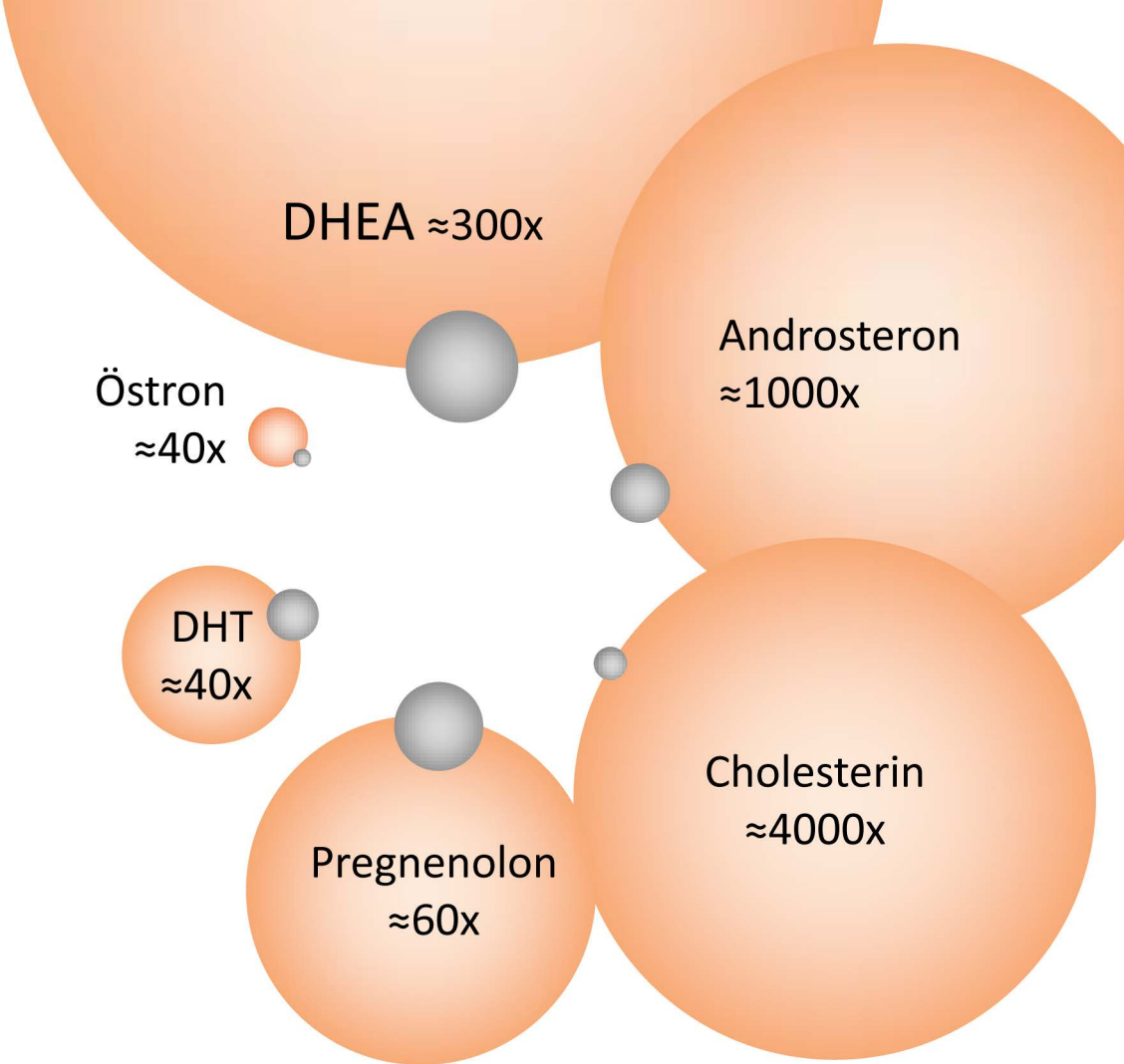
Autoren

	<p>Hendrik Reuper 2011-2014 BA-Studium an der TU Braunschweig. Seit 2014 MA-Studium in Braunschweig. 2015 Forschungsaufenthalt in Umeå (Schweden). Seit 2016 Erasmus-Student an der University of Birmingham bei Dr. Mueller.</p>
	<p>Jonathan Wolf Mueller 1996-2001 Biochemie-Studium in Halle (Saale). 2001-2004 Promotion am Max-Planck-Institut in Dortmund. 2007 und 2011 EMBO Research Fellow am MRC National Institute for Medical Research in London. 2012 Habilitation an der Universität Duisburg-Essen. Seitdem an der University of Birmingham, erst als Marie Curie Senior Research Fellow, dann als Lecturer in Endocrine Biochemistry. 2015 Alfried Krupp Fellow am Wissenschaftskolleg Greifswald.</p>

Die Analytik von Steroiden aus Serumproben wird bei uns im Labor standardmäßig mittels Flüssigchromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durchgeführt [2,6]. DHEA sowie einige andere Steroide (Androstenedion, Testosteron und DHT) werden vor der eigentlichen Messung chemisch zu Oximen derivatisiert, um ihre Detektion im Positivmodus zu erleichtern. DHEAS messen wir auf verschiedene Weise; entweder direkt im Negativmodus oder analog zu DHEA nach enzymatischer Dekonjugation [2,6]. Besonders wenn der Quotient aus sulfatiertem und freiem Steroid möglichst exakt bestimmt werden soll, bringen Ansätze mit zweifacher Messung experimentelle Nachteile. Hier wären neuere Entwicklungen wünschenswert – spannend ist darüber hinaus zu verfolgen, was MS-Imaging in Zukunft ermöglichen wird.

[2] Idkowiak J, Taylor AE, Subtil S et al. (2016) Steroid sulfatase deficiency and androgen activation before and after puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 101:2545–2553

[6] Oostdijk W, Idkowiak J, Mueller JW et al. (2015) PAPSS2 deficiency causes androgen excess via impaired DHEA sulfation – in vitro and in vivo studies in a family harboring two novel PAPSS2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E672–E680



DHEA ≈300x

Androsteron
≈1000x

Östron
≈40x

DHT
≈40x

Pregnenolon
≈60x

Cholesterin
≈4000x

direktes Binden an
nucleäre Rezeptoren

HO

downstream
conversion

